# 自然条件下铜绿蝇蛹发育形态及其法医学意义

王　贺[1]，王　辉[2]，王卫杰[1]，李　嘉[3]，赵文爱[1]，齐莉莉[1,*]

(1. 河北医科大学病原生物学教研室，石家庄 050017；2. 河北医科大学第一医院骨科，石家庄 050000；
3. 河北医科大学临床学院教务科，石家庄 050000)

**摘要：**【目的】研究自然条件下铜绿蝇 *Lucilia cuprina* 蛹期蛹壳颜色变化和蛹的形态发育规律从而为死后间隔时间(postmortem interval, PMI)的推断提供理论依据。【方法】在室外自然条件下饲养铜绿蝇直至其化蛹,每 12 h 取蛹 10 头,固定、观察,并利用图像分析系统收集并分析蛹壳颜色的变化信息;在体式显微镜下剥离蛹壳,观察蛹体外部形态变化并拍照记录,描述蛹期发育特征。【结果】自然条件下,铜绿蝇蛹壳颜色随时间呈现逐渐加深趋势,尤其在化蛹初期和临近羽化时变化明显,根据采集到的蛹壳颜色 RGB 值可做出标准色板。蛹的形态发育呈规律性变化,可将蛹期划分为 8 个阶段,包括隐头期、显头期、棕翅期、黑鬃胸期、黑鬃腹期、半红眼期、红眼期和预成虫期。【结论】在案发现场,蛹壳颜色标准色板可用于目视比色,初步粗略估算蛹期,同时依据蛹期发育阶段进程表可进一步推算化蛹后时间,从而推断 PMI。

**关键词：**铜绿蝇；法医昆虫学；嗜尸性昆虫；死后间隔时间；蛹；形态发育；标准色板

**中图分类号：**Q964　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2017)02-0222-07

# Pupal morphogenesis of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) under natural conditions and its significance in forensic medicine

WANG He[1], WANG Hui[2], WANG Wei-Jie[1], LI Jia[3], ZHAO Wen-Ai[1], QI Li-Li[1,*] (1. Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3. Department of Teaching Affairs, Clinical College of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract:**【Aim】This study aims to examine the changing trend of puparium color and the pupal morphogenesis of *Lucilia cuprina* so as to provide relatively systematic pupal developmental data of this insect for the estimation of the postmortem interval (PMI).【Methods】Ten pupae were sampled at 12 h intervals from prepupa to emergence under natural conditions. The sampled pupae were fixed and observed, and the corresponding color indexes of puparium were collected and analyzed by digital image processing system. Then the pupae were dissected and their puparia were removed, and the external morphological changes of the pupae were observed and photographed under stereomicroscope. The morphological characteristics of pupae were described.【Results】The color of *L. cuprina* puparium gradually deepened with the developmental time, and obvious changes were observed at the beginning and final time of the pupal period. Based on the analyzed RGB indexes, a standard color plate of puparium was made. The pupal morphogenesis can be divided into eight stages, including cryptocephalic stage, phanerocephalic stage, brown thorax setae stage, tanned thorax setae stage, tanned abdomen setae stage, part pigmented eye stage, entire pigmented eye stage and preadult stage.【Conclusion】At the crime scene, the standard color plate of puparium can be used to preliminarily estimate the pupal stage through visual comparison, and based on the chronometrical morphology of *L. cuprina* pupae, the postmortem interval can be deduced.

**Key words:** *Lucilia cuprina*; forensic entomology; necrophagous insect; postmortem interval; pupa;

作者简介：王贺，女，1980 年 10 月生，河北辛集人，硕士，讲师，研究方向为法医昆虫学及昆虫毒理学，E-mail: wanghe1007@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: qilili1983@126.com
收稿日期 Received: 2016-11-25；接受日期 Accepted: 2017-01-26

morphogenesis; standard color plate

死后间隔时间(postmortem interval, PMI),即死亡发生至尸体被发现的时间间隔,是法医昆虫学的主要研究内容之一(胡萃, 2000)。精确推断 PMI 对刑事案件的侦破具有极其重要的意义,而对高度腐败或白骨化的尸体而言,常规法医学方法通常无法奏效,这时在尸体上取食的昆虫则能提供很多重要信息(李学博等, 2013)。蝇类是最先到达尸体的嗜尸性昆虫之一,其生长发育进程的研究一直是推断中晚期 PMI 的关键。

蛹期是蝇类生活史的重要阶段,蝇的变态发育主要在蛹期完成,蝇蛹是死亡现场常能发现的最多虫态之一,因此,为了及时准确地推断 PMI,蝇蛹发育时间的确定就显得至关重要(王江峰等, 2002)。最早将蝇蛹发育形态研究用于法医学领域的是 B. Greenberg,他观察了伏蝇 *Phormia regina* 裸蛹的形态变化,并将其与发育时间联系起来推断蛹期(Greenberg, 1995)。国内此类研究尚少,涉及蝇种亦较少,有待进一步开展。铜绿蝇 *Lucilia cuprina* 是石家庄地区夏秋季的常见蝇种,属嗜尸性蝇类中与法医学关系最密切的丽蝇科绿蝇属 *Lucilia* 中的一种。通常情况下,利用丽蝇一代的生长发育规律推断死亡时间最为精确(Baumjohann *et al*., 2011),在命案现场调查中与丽蝇相关的案例也最为常见。有鉴于此,我们开展了本研究。

# 1　材料与方法

## 1.1　试虫来源

在河北医科大学校园内,用兔内脏诱捕铜绿蝇 *L. cuprina* 成蝇,带回实验室,置于养蝇笼内饲以清水、白糖和奶粉,建立种群,饲养至第 3 代成蝇为母代开始实验。蝇种按照《中国蝇类检索表》(范滋德, 1997)系统进行分类鉴定。

## 1.2　试虫培养及取样

将养蝇笼置于提前制作好的试验用箱内(确保试验箱顶部及底部封闭良好,可以防雨,两侧面用通风透光的密纹铁砂网封闭好)防止其他昆虫钻入,将试验箱置于室外通风的树荫处模拟自然现场。

以新鲜瘦猪肉诱成蝇产卵,把产出时间相差不超过半小时的卵块移入一50 mL 烧杯中并置于铺有薄层沙土的养虫缸内,用密纹尼龙纱将养虫缸封口,防止其他昆虫钻入或者幼虫爬出,连续饲养直至50% 幼虫化蛹开始。化蛹的标准是:当用大头针刺激幼虫时,幼虫对刺激没有伸展或移动等反应(杨惠霞, 2002)。记录化蛹开始时间,将蛹连同沙土移入新瓶内,每隔 12 h 取样 1 次,直至半数羽化;每次皆取 10 头标本,用 4% 的甲醛固定液固定 24 h,然后放入 75% 酒精中保存。

## 1.3　实验地点平均温度的测量

在实验用箱中悬挂放置干湿温度计,定时观察并记录整理。据以往实验测量温度数据分析,一天中 4 个时间点的平均温度接近实际日平均气温的程度略好(杨帆等, 2015),所以本实验采用一天当中的 8:00, 14:00, 20:00 和 24:00 这 4 个时间点的实验箱内温度,取其均值作为实验场地平均温度,同时与实验期间石家庄市区日平均气温做分析对比(取每日最高、最低温并计算均值,此数据由气象数据网提供)。

## 1.4　蛹壳颜色变化的观察与分析

在 OLYMPUS X-Tr 型体视显微镜下,维持 50 Hz 光源强度观察蛹体并用 Cannon EOS600D 数码相机拍照。用 PHOTOSHOP 软件对照片做预处理,将 RGB 配色表中 RGB 分量分别为 190 的灰色(grey)色卡设立为参照卡,所得图片以参照卡为标准对其亮度、明暗度等校准到视差允许范围内,用颜色取样器(颜色取样器选项栏中的取样大小设为“5 × 5”,即一次读取 5 × 5 像素区域的平均值)随机选取蛹壳上 20 个像素点,读取各点 RGB 值,计算其平均值,绘制 RGB 值随蛹生长发育的变化曲线;还原 RGB 值,填充为标准的单一色卡,作为蛹壳颜色的标准色板。

## 1.5　裸蛹的解剖剥离

在 OLYMPUS X-Tr 型体视显微镜下,仔细挑开蛹壳,观察蛹内虫体的形态变化,找出具有时间标志性的特征,并据此进行阶段划分,列出蛹发育进程表。

## 1.6　数据统计

本研究测得的数据处理用 SPSS16.0 软件;处理图片用 PHOTOSHOP 软件;用 Excel 软件做表。

# 2　结果

## 2.1　铜绿蝇蛹壳颜色的变化

自然条件下,蛹壳颜色随发育时间总体呈现逐渐加深趋势,第 1 天一般为黄白色或黄色,逐渐变为红褐色,红褐色蛹壳占据蛹期绝大部分时间,直到临

近化蛹时，由于透过蛹壳可看到内部蛹体组织，此时的蛹已全身布满黑褐色鬃毛，所以蛹壳颜色呈褐色到黑褐色。可见，蛹壳颜色在化蛹初期和临近羽化时变化较大（图 1：A–H）。

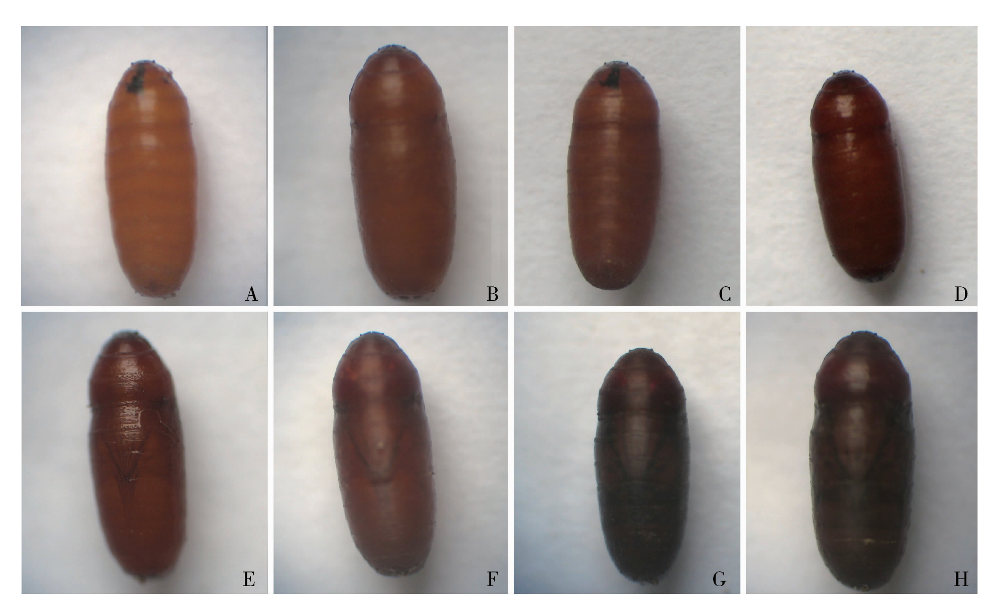



图 1 自然条件下铜绿蝇蛹期蛹壳颜色变化

Fig. 1 Changes in the color of puparium of *Lucilia cuprina* during development under natural conditions

A：12 h，隐头期 Cryptocephalic stage；B，C，D：24 – 72 h，显头期、棕翅期 Phanerocephalic stage，brown thorax setae stage；E：84 h，黑棕胸期 Tanned thorax setae stage；F：96 h，黑鬃腹期 Tanned abdomen setae stage；G：108 h，半红眼期 Part pigmented eye stage；H：120 h，红眼期、预成虫期 Entire pigmented eye stage，preadult stage.

利用图像分析软件得出蛹壳颜色的 RGB 值随蛹的生长发育均呈现由大到小的变化趋势，但此变化不均匀，在化蛹初期和临近羽化时变化较大，中间变化平缓；其中 R 值变化最明显，化蛹初期可达 139，而临近羽化时仅为 68；G 和 B 值变化平稳（图 2）。自然条件下（日均温度 27 ~ 28℃），蛹壳的 RGB 值变化较 28℃ 恒温条件下更迅速（王贺，2008）；根据 RGB 值利用图像分析软件做出蛹壳颜色随发育时间的标准色板（图 3），在实际工作中应用方便，可将相似自然条件下的案发现场取得的待测蛹清洗处理后，与标准色板目视比色，可粗略估算蛹的发育时间，从而初步快速推断 PMI。

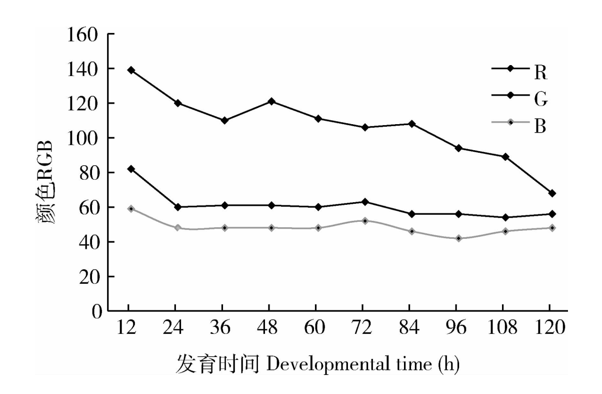



图 2 自然条件下铜绿蝇蛹期颜色 RGB 变化曲线

Fig. 2 RGB change curve of the color of puparium of *Lucilia cuprina* under natural conditions

## 2.2 铜绿蝇蛹体形态变化及阶段划分

体视显微镜下观察到 6 个具有时间标志性的蛹期特征：Ⅰ，蛹体分头、胸、腹（图 4：B）；Ⅱ，头咽骨贴壁（图 1：A）；Ⅲ，呼吸角破壳（图 1：B）；Ⅳ，翅与足出现及褐化（图 4：C，D）；Ⅴ，鬃毛出现及褐化（图 4：E，F）；Ⅵ，复眼色素化进程（图 4：J，H，I）。据此可将铜绿蝇蛹期划分为 8 个阶段：隐头期、显头期、棕翅期、黑鬃胸期、黑鬃腹期、半红眼期、红眼期和预成虫期（表 1）。蛹期各阶段发育时间分别为隐头期 12 h；显头期 24 – 72 h；棕翅期 60 – 72 h；黑鬃胸期 84 h；黑鬃腹期 96 h；半红眼期 108 h；红眼期和预成虫期 120 h（图 4：A – I）。

## 2.3 气温及铜绿蝇发育历期

本实验所用铜绿蝇在自然条件下饲养，实验箱内 4 个时间点平均温度为 28.1℃，大气平均温为 27.6℃，两者基本一致，可认为实验所处大气平均温为 27 ~ 28℃。幼虫期和蛹期共历时 11.0 d，其中，从产卵开始计时至半数幼虫化蛹历时 6.0 d，从化蛹开始至半数羽化历时 5.0 d（表 2）。

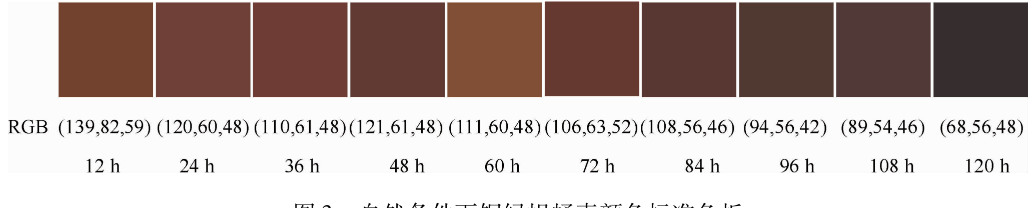



图 3　自然条件下铜绿蝇蛹壳颜色标准色板

Fig. 3　The standard color plate of the puparium of *Lucilia cuprina* under natural conditions

图 4　自 然条件下铜绿蝇蛹体发育形态变化

Fig. 4　Pupal morphogenesis of *Lucilia cuprina* under natural conditions

A：12 h，隐头期（腹面观）Cryptocephalic stage (ventral view)；B：24 – 72 h，显头期（背面观）Phanerocephalic stage (dorsal view)；C：24 – 72 h，显头期（腹面观）Phanerocephalic stage (ventral view)；D：60 – 72 h，棕翅期（腹面观）Brown thorax setae stage (ventral view)；E：84 h，黑棕胸期（背面观）Tanned thorax setae stage (dorsal view)；F：96 h，黑鬃腹期（背面观）Tanned abdomen setae stage (dorsal view)；G：108 h，半红眼期（背面观）Partpigmented eye stage (dorsal view)；H：120 h，红眼期（背面观）Entire pigmented eye stage (dorsal view)；I：120 h，预成虫期（背面观）Preadult stage (dorsal view).

**表 1 自然条件下铜绿蝇蛹期发育进程表**

**Table 1 Chronometrical morphology of *Lucilia cuprina* pupa under natural conditions**

| 化蛹后时间(h)<br>Time after pupation | 发育阶段<br>Developmental stages | 形态特征<br>Morphological characteristics |
|---|---|---|
| 12 | 隐头期<br>Cryptocephalic stage | 蛹体未现头、胸、腹;一对肉色呼吸角初现;头咽骨贴壁,蛹壳外清晰可见。<br>Pupal body without distinct head, thorax and abdomen; an ivory pair of respiratory horns emerged; cephalopharyngeal skeleton appeared on the puparium. |
| 24 – 60 | 显头期<br>Phanerocephalic stage | 蛹体分头、胸、腹 3 部分;呼吸角破壳;出现翅与足且为乳白色;复眼轮廓形成。<br>Pupal body apparently divided into 3 parts (head, thorax and abdomen); brown respiratory horns protruded; oyster white artus formed; profile of compound eye formed. |
| 72 | 显头期、棕翅期<br>Phanerocephalic stage and brown thorax setae stage | 部分蛹体翅与足根部着棕色;蛹体出现浅色鬃毛;<br>复眼呈黄色,周围被稀疏浅色鬃毛。<br>Bases of wings and artus turned brown; setae emerge; yellow compound eye with brown setae surrounded. |
| 84 | 黑鬃胸期<br>Tanned thorax setae stage | 仅头胸部具稀疏的黑色鬃毛。<br>Only head and thorax with tanned and sparse setae. |
| 96 | 黑鬃腹期<br>Tanned abdomen setae stage | 头、胸部鬃毛变密;腹部出现稀疏黑色鬃毛。<br>Head and thorax setae thicken; abdomen setae tanned. |
| 108 | 半红眼期<br>Part pigmented eye stage | 复眼后半部呈红色。<br>Posterior part of compound eye becomes bright red. |
| 120 | 红眼期<br>Entire pigmented eye stage | 复眼全部为鲜红色。<br>Whole compound eye becomes cherry. |
| | 预成虫期<br>Preadult stage | 复眼全部为深红色;蛹体全身被浓密黑色鬃毛。<br>Whole compound eye becomes crimson; pupal body with thick tanned setae. |

**表 2 平均气温的比较**

**Table 2 Comparison of the average temperature**

| 观察日期(月-日)<br>Observation date (month-day) | 箱内 4 个时间点温度平均值(℃)<br>Mean temperature of 4 time points in the box | 大气温度均值(℃)<br>Mean air temperature |
|---|---|---|
| 8-1 | 28.5 | 28.0 |
| 8-2 | 27.5 | 26.5 |
| 8-3 | 26.8 | 26.5 |
| 8-4 | 28.8 | 28.5 |
| 8-5 | 28.6 | 28.0 |
| 8-6 | 27.9 | 27.0 |
| 8-7 | 26.9 | 26.5 |
| 8-8 | 28.4 | 27.5 |
| 8-9 | 29.0 | 29.0 |
| 8-10 | 28.7 | 28.5 |
| 8-11 | 28.2 | 28.0 |
| 平均值 Average | 28.1 | 27.6 |

4 个时间点为 8:00, 14:00, 20:00 和 24:00。The four time points include 8:00, 14:00, 20:00 and 24:00.

## 3 讨论

本实验在自然条件下对铜绿蝇的蛹壳颜色变化、蛹体形态特征进行了研究,以此来充实法医昆虫学研究的基础资料。作者试图探寻利用尸食性蝇类蛹期发育特征快速判断死亡时间的简便而实用的方法,蛹体形态发育虽然可找出很多时间标志性特征,但蛹体剥离技术要求较高,需要精细且专业的操作,而蛹壳颜色的观察简便易行,但又易受观察者主观色觉差异的影响而标准不一,因此我们展开了本研究。

蛹壳颜色自化蛹后呈现规律性变化,可作为蝇蛹日龄的良好指标。国内很多学者都曾观察到化蛹后蛹壳颜色由淡黄色至粉红色,之后逐渐加深(王江峰等, 2002),并得出根据蛹的颜色可进一步更准确地推断死亡时间的结论,但尚未见以蛹壳颜色建立标准来推断蝇蛹发育时间的报道。早在 1995 年, B. Greenberg 就曾提出根据蛹壳颜色变化的过程,建立一个颜色与化蛹后时间一一对应的标准色板

(Greenberg, 1995)，再以待检蛹壳与标准色板比对，即可得出蝇蛹日龄的想法，但至今尚未见进一步相关报道。记录及显示彩色图像时，RGB 是描述色彩信息最常用的模式之一，彩色图像中每个像素的 RGB 分量指定一个介于 0(黑色)到 255(白色)之间的数值，任意一组 RGB 值都将代表一个单一的标准颜色。本实验利用图像分析软件随机选取不同发育阶段的蛹壳固定范围内的 20 个像素点，计算其 RGB 均值，再将此值还原成单一标准色卡即为该发育阶段蛹壳标准色板，在实际推断 PMI 时，可目视比色，推测蛹期。

由于 RGB 值组成有上万种，用其表示色彩是相当灵敏的，但采集图像时要保证光源的方向及强度始终一致，以尽量减少成像亮度和明暗度对分析颜色的影响。本试验初步探寻一些解决方法：(1)拍照时操作连贯，固定相机位置，保证标本与物镜之间的相对位置不变；光源位置及强度固定；(2)设立参照卡，读取 RGB 值前，应用图像分析软件将所有图片的色阶、对比度、色调等以参照卡为标准校正到肉眼不可分辨范围内；(3)尽可能多地选取随机像素点。因此，标准色板只用于肉眼比色，粗略估算蛹期，要精确推断日龄还需结合蛹体形态发育或者其他生理生化指标(李凯, 2006; 郑娜等, 2016)。另外，红褐色蛹壳存在时间较长，作者曾竭力试图将红褐色阶段再分，但由于此阶段颜色变化视觉差甚小而很难操作，这与 Greenberg(1995)的蛹壳从白色到黑褐色的转变可提供前 10 个多小时的颜色标志的结论相似，可见，利用蛹壳颜色推断蛹期的方法在化蛹初期和临近羽化阶段意义较大，因此将来的实验可以主要集中在初化蛹 12 h 内，把此时期内每 1 h 的蛹壳颜色变化做成标准色板或将 RGB 数据进行曲线拟合，从而提高利用蛹壳颜色推断 PMI 的精确性和实用性。

从蛹发育进程表可见，蛹期各个阶段持续时间不均匀，蛹的开始阶段和临近羽化时持续时间短，即形态变化较大。在本次实验条件下，前蛹期可能存在但时间极短，故未观察到，最早采集到的标本内蛹体已进入隐头期。显头期占据了蛹期相当长的时间，此时期蛹体表面几乎没有特征的变化，但蝇蛹是整个变态发育的关键时期并且是一个连续过程，显头期蛹体内部结构正在发生巨大的变化(Tuçe and Osman, 2014)，可以考虑通过蛹体内部解剖结构的变化来解决此期划分，但变态阶段各组织器官尚处发育阶段，形态变化复杂，需要相当丰富的专业知识去辨认，实际应用困难。

国内外很多研究者都发现并认同了呼吸角在蛹期阶段划分中的时间标志性意义(Ma *et al.*, 2015)。本文进一步探究蛹期时间标志性特征，比如翅与足的形成及褐化度：翅与足的形成始于显头期，褐化始于棕翅期，到黑鬃腹期，翅与足全部变黑；复眼的色素化进程是蛹发育后期推断时间的有力指标。复眼颜色从开始变红到成蝇羽化，基本在 12 h 内完成，复眼的着色是一个连续的变化过程，此色素化过程主要包括：(1)红色着色面积的扩大；(2)红眼期后色度加深。怎样采集复眼色素化信息，建立其随发育时间的拟合方程，从而将蛹后期作更详细的划分，有待进一步研究。

嗜尸性蝇类生活周期极易受环境因素影响，如环境温度、湿度、日周期、风力和现场尸体状况等，而对蝇发育的常规研究方法多是在实验室恒温恒湿条件下进行的，显然不能满足案发现场的真实变化(Michaud *et al.*, 2012)。在自然环境下研究铜绿蝇蛹的发育规律，增加了研究的实用性。

本实验利用图像分析软件提取不同发育时间的蛹壳色素点信息并将其转化为标准色板，初步建立一个与蛹期发育时间一一对应的比色板，可粗略估算蛹期，此法是实际法医工作中快速推算死亡时间的一种简便实用方法的初探。同时，可结合蛹体发育阶段进一步推测蛹期从而推断 PMI，实际应用中选择尸体周围土壤中可检获到的颜色最深的蛹可以提高准确度(马孟云等, 2016)。本实验标本采集间隔为 12 h，可能会有蛹体发育特征未捕捉到，以后可缩短标本采集时间间隔，尤其是化蛹初期及临近羽化阶段，可每小时采集标本一次，尽量多地捕捉颜色变化信息，发掘新的蛹体变化特征，更细化蛹期划分。此外，考虑到蛹体发育个体差异的客观存在，以后的实验应尽量增加样本量以使蛹壳颜色的采集信息更丰富更准确。

## 参考文献（References）


Baumjohann K, Schiwy-Bochat K, Rothschild MA, 2011. Maggots reveal a case of antemortal insect infestation. *Int. J. Legal. Med.*, 125: 487 - 492.

Fan ZD, 1997. Fauna Sinica. Insecta, Vol. 6. Diptera: Calliphoridae. Science Press, Beijing. 96 - 100. [范滋德, 1997. 中国动物志. 昆虫纲, 第 6 卷. 双翅目: 丽蝇科. 北京: 科学出版社. 96 - 100]

Feng DX, Liu GC, 2014. Pupal age estimation of forensically important *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae). *Forensic Sci. Int.*, 236

(3): 133 – 137.

Greenberg B, 1995. Flies as forensic indicators. *J. Med. Entomol.*, 28 (5): 553 – 577.

Hu C, 2000. Forensic Entomology. Chongqing Press, Chongqing. 11 – 21. [胡萃, 2000. 法医昆虫学. 重庆: 重庆出版社. 11 – 21]

Li K, 2006. Fundamental Research on the Application of Molecular Identification and Biochemical Characters of Necrophagous Flies in the Determination of Postmortem Interval. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [李凯, 2006. 尸食性蝇类的分子鉴别及其发育生物化学特征用于死后间隔时间推断的基础研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文]

Li XB, Gong Q, Wan LH, Jiang D, Jiao YG, 2013. Auxiliary inference of the postmortem interval with necrophagous flies. *Chin. J. Forensic Med.*, 28(3): 248 – 249. [李学博, 巩强, 万立华, 江东, 焦亚光, 2103. 利用嗜尸性蝇类辅助推断死亡时间. 中国法医学杂志, 28(3): 248 – 249]

Ma MY, Wang Y, Dong YY, Wang JF, 2016. Discussion on forensic entomology standards and guidelines for the on-site operation. *Forensic Sci. Tech.*, 41(2): 142 – 146. [马孟云, 王禹, 董玉友, 王江峰, 2016. 法医昆虫学检验现场操作标准探讨. 刑事技术, 41(2): 142 – 146]

Ma T, Huang J, Wang JF, 2015. Study on the pupal morphogenesis of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) for postmortem interval estimation. *Forensic Sci. Int.*, 253(8): 88 – 93.

Michaud J, Schoenly G, Moreau G, 2012. Sampling flies or sampling flaws: experimental design and inference strength in forensic entomology. *J. Med. Entomol.*, 49(1): 1 – 10.

Tuçe K, Osman S, 2014. The analysis of pupal development period in *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) forensically important insect. *Int. J. Legal. Med.*, 1: 1 – 12.

Wang H, 2007. Pupal Morphogenesis of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in Different Constant Temperature and its Significance in Forensic Medicine. MSc Thesis, Hebei Medical University, Shijiazhuang. [王贺, 2007. 铜绿蝇蛹发育形态学用于死后间隔时间推断的研究. 石家庄: 河北医科大学硕士学位论文]

Wang JF, Hu C, Chen YC, Min JX, Li JT, 2002. Using the pupal morphogenesis of *Aldrichina grahami* to estimate the postmortem interval. *Acta Entomologica Sinica*, 45(5): 696 – 699. [王江峰, 胡萃, 陈玉川, 闵建雄, 李俊涛, 2002. 用巨尾阿丽蝇蛹期发育形态来推断死者死亡时间. 昆虫学报, 45(5): 696 – 699]

Yang F, Li J, Qi LL, Wang H, Li ZM, 2015. The effect of morphine on the larvae of *Chrysomya megacephala* in nature. *Chin. J. Path. Biol.*, 10(11): 1012 – 1016. [杨帆, 李嘉, 齐莉莉, 王贺, 李泽民, 2015. 自然条件下吗啡对大头金蝇幼虫生长发育情况的影响. 中国病原学杂志, 10(11): 1012 – 1016]

Yang HX, 2002. Chronometrical Morphology Changes of Larval Cephalopharyngeal Skeleton of *Parasarcophaga crassipalpi* and *Aldrichina grahami* in Different Temperatures and their Implications in Forensic Medicine. MSc Thesis, Hebei Medical University, Shijiazhuang. [杨惠霞, 2002. 温度对巨尾阿丽蝇和肥须亚麻蝇幼虫头咽骨发育的影响及其法医学意义. 石家庄: 河北医科大学硕士学位论文]

Zheng N, Shi XZ, Zhu GH, Niu HB, Fan XM, Liu J, Chen XX, 2016. The forensic significance of characteristics of the protein degradation in puparium cases of *Chrysomya megacephala*. *Chin. J. Forensic Med.*, 31(4): 355 – 357. [郑娜, 石学志, 朱光辉, 牛憨笨, 范新民, 刘杰, 陈献雄, 2016. 大头金蝇蛹壳蛋白质降解特征的法医学意义. 中国法医学杂志, 31(4): 355 – 357]

(责任编辑: 赵利辉)